

脳転移性エクソソームによる前転移ニッシェの解明および研究の総括
研究代表者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野・分野長

研究要旨

本研究の目的は、乳がん細胞の血液脳関門(BBB)通過の分子メカニズムや、その前転移ニッシェの分子機構の解明、脳転移機構におけるトロピズムを乳がん細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームを中心に明らかにすることで、癌の脳転移を予防する新しい方策を開発することである。平成24年度は、おもに脳転移における癌細胞がBBBを通過する仕組みを、細胞間の新たなコミュニケーションツールであるエクソソームの本体解明を中心に解析する目的で、脳に高転移性を示すヒト乳がん細胞株を樹立し、この乳がん細胞株が分泌するエクソソームがBBBにどのような影響を与えるかを解析した。その結果、脳に高転移する乳がん細胞から分泌されたエクソソームが、BBBの機能を破壊し、もともとBBBを通過しないはずの低転移乳がん細胞をBBB通過させることがわかった。平成25年度は、初年度に引き続き、脳転移におけるがん細胞がBBBを通過する仕組みをエクソソーム中のmicroRNA解明を中心に解析することで、この乳がん細胞株が分泌するエクソソームがBBB破綻を誘導するメカニズムを解析した。その結果、脳に高転移する乳がん細胞から分泌されたエクソソームのBBB破綻は、エクソソームにパッケージされた特定のmicroRNA(miR-18X)が脳血管内皮細胞の細胞間接着を司る分子を制御する事で、タイトジャンクション、あるいは接着ジャンクションの破綻を誘導する結果を得た。さらにこのBBB破綻のmiR-18Xは、実際の脳転移を有する患者血清中に高い値を示す事も明らかとなり、臨床での実証研究も基礎研究データを支持するものであった。

A. 研究背景、目的 (背景)

癌の脳転移は近年増加傾向にある。とりわけ、乳がんでは、ある特定のサブタイプに脳転移を多く認め、その生物学的特性と転移臓器におけるトロピズムの存在が示唆される。近年の分子標的治療薬の進歩により生存期間が延長した癌患者に脳転移は今後頻発すると予測され、我が国において脳転移の治療と管理法の開発は緊急かつ重要な課題である。癌転移のメカニズムには、癌細胞が脳血管関門(BBB)を通過し、脳内で腫瘍を形成できるよう、あらかじめ血管内皮細胞や間質成分などがニッシェ(前転移ニッシェ)を形成することが癌細胞の定着や増殖の最初のプロセスに重要である。本研究の目的は、BBB通過の分子メカニズムや、その前転移ニッシェの分子機構の解明、脳転移機構におけるトロピズムを乳がん細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームを中心に明らかにすることで、癌の脳転移を予防する新しい方策を開発することである。

B. 研究方法

平成24年度は、おもに脳転移における癌細胞がBBBを通過する仕組みを、細胞間の新たなコミュニケーションツールであるエクソソームの本体解明を中心に解析する目的で、脳に高転移性を示すヒト乳

がん細胞株を樹立し(落谷、小野)この乳がん細胞株が分泌するエクソソームがBBBにどのような影響を与えるかを、BBBの電気抵抗値の測定による破壊の有無の判定およびBBBの本質である脳血管内非細胞の形成するタイトジャンクションへの影響を免疫組織学的に解析する方法を選択した。

2年次となる平成25年度は、おもに脳転移における癌細胞がBBBを通過する仕組みを、エクソソームの中のmicroRNAを中心に解析する目的で、初年度に樹立した脳に高転移性を示すヒト乳がん細胞株(落谷、小野)の分泌するエクソソームからRNAを抽出し、そのmicroRNAの網羅的発現解析を実施し、そのデータを解析することで、BBB破綻を誘導するmicroRNAを同定し、その分子メカニズムを解明した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づくカルタヘナ法)の定める細則と、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則、ならびに施設内の組み換えDNA実験指針の基準に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従ってDNA組み換え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に行う。動物実験は、国立がん研究センターの定める動物実験指針に従うとともに、動物倫理委員会の承認を得たうえで、動物の苦痛の低減に務め、

動物愛護の精神に基づく実験を行う。ヒトの臨床サンプルの miR-29 はメチル化酵素と脱メチル化酵素の両者ル解析に関しては、センターの倫理審査委員会の承認を抑制することにより、メチルの変化を抑えエビデンスを得て実施する。ヒト臨床検体の使用は、所内の倫理委員エネティック状態を維持して癌化を防いでいる。会に計画書を提出し、審査を受けて承認が得られている。miR-18X に関しては、解析を続行中であり、メチル化の変動がエクソソームへのパッケージング促進に関与しているかどうかを判定する。

C. 研究結果

まず、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231LN 細胞(低い脳転移率)を scid マウスに左心室投与で移植し、1/5 の低頻度で脳転移したマウスから転移腫瘍を摘出し、培養、移植のサイクルを繰り返した結果、3/5 の高頻度で脳転移する細胞株を 2 株樹立した。これらの脳高転移乳がん細胞株の分泌するエクソソームを超高速遠心法にて分離精製し、その生物学的性状を BBB に与える影響を観察する事で検討した。BBB は、サルの脳血管内被細胞、pericyte(血管周囲細胞)及びアストロサイトから構成される BBB を in vitro で模倣したシステムを用いた。結果の解釈は、BBB の形成により生まれる電気的抵抗値を変動させるかどうかで判断した結果、低転移の細胞由来のエクソソームに比較して、高転移の細胞由来のエクソソームを添加する事で、電気抵抗値が顕著に低下することが明らかとなった。さらに small compound の透過性を検証したところ、やはり高転移の細胞由来のエクソソームの処理によって、BBB の物質透過性が更新する事実が判明した。

さらに平成 25 年度の研究目的であるエクソソームの microRNA 網羅的発現解析の結果、脳に高転移する乳がん細胞から分泌されたエクソソームの BBB 破壊は、エクソソームにパッケージされた特定の microRNA (miR-18X)が脳血管内皮細胞のタイトジャンクションを司る分子を制御する事で、タイトジャンクション、あるいは接着ジャンクションの破綻を誘導する結果を得た。さらにこの BBB 破綻の miR-18X は、実際の脳転移を有する患者血清中に高い値を示す事も明らかとなり、臨床での実証研究も基礎研究データを支持するものであった。

以上の成果は、高転移の細胞由来のエクソソームには BBB を破綻させる能力が有る事が示唆された。さらに、血管内皮細胞のタイトジャンクションを形成する occludin, claudin 等、あるいは接着ジャンクションを形成する N-cadherin 等の分子の免疫染色を実施した結果、高転移の細胞由来のエクソソーム処理によって、これらの分子の細胞表面の局在が失われることが判明した。従ってエクソソームに由来する miR-18X の標的分子群が、これらのジャンクションを制御する分子あるいは関連制御分子である可能性が浮上した。また、国立がん研究センター中央病院の乳腺腫瘍科のコホート研究の一部の血清を用いて、ステージ 3/4 の転移患者の miR-18X の量を解析した結果、脳転移を有する患者群で、血清中の miR-18X の量が有意に高い事も判明した。

さらに、畑田らは転移性乳癌細胞の網羅的 DNA メチル化解析を MBD1-DIP Seq 法を用いておこない、転移に関連する miRNA の候補をみつけた。ま

D. 考察

エクソソームによって引き起こされる BBB 破壊のメカニズムを明らかにするに至るとともに、BBB を破壊する microRNA の臨床的意義にまで研究を発展する事が出来た事は特筆に値する研究成果である。

E. 結論

脳への高い転移性を有する乳癌細胞の分泌するエクソソームには、血液脳関門を破壊し、乳がん細胞を脳に転移する機構が存在する事が示唆された。さらに、こうした現象の原因となりうるエクソソーム中のマイクロ RNA の存在も、臨床検体の解析から示唆された事は意義の有る研究成果であり、今後はこうした転移性エクソソームの診断が乳がん患者の治療方針決定の上で有効であるかどうかを判断するとともに、転移性エクソソームを抑制する治療戦略が脳転移阻止のための新規治療法となるかどうかを検討するための基盤データを獲得する事が出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*, 287:1397-1405, 2012
2. Kosaka N, Ochiya T. Unraveling the mystery of cancer by secretory microRNA: horizontal microRNA transfer between living cells. *Front Genet*, 2:97, 2012
3. Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A. Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:4263-4268, 2012
4. Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Kato T. Micromanaging iron homeostasis - Hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem*, 287:34110-34119, 2012

5. Ochiya T. Secretory microRNAs by Exosomes as a versatile communication tool. *Dent Med Res*, 32:158-161, 2012
6. Ono M, Takeshita F, Tominaga N, Takahashi RU, Kosaka N, Tsuda H, Tamura K, and Ochiya T. Exosomes secreted by bone marrow-derived mesenchymal stem cells regulate cancer stem cell dormancy. *Science Signaling*, in press
7. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature Communications*. 5:3591, 2014
8. Fujita Y, Takeshita F, Mizutani T, Ohgi T, Kuwano K, Ochiya T. A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer. *Sci Rep*, 3:3325, 2013
9. Fujiwara T, Kawai A, Yoshida A, Ozaki T, Ochiya T. Cancer stem cells of sarcoma. In: *Role of cancer stem cells in cancer biology and therapy*. USA, CRC Press, pp 23-78, 2013
10. Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering *ASXL1* mutations. *J Clin Invest*, 123:4627-4640, 2013
11. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*, 288:10849-10859, 2013
12. Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, Hagiwara K, Katsuda T, Ono M, Ochiya T. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:376-382, 2013
13. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet*, 4:173, 2013
14. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Ochiya T. Functional analysis of exosomal microRNA in cell-cell communication research. *Methods Mol Biol*, 1024:1-10, 2013
15. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*, 21:185-191, 2013
16. Suetsugu A, Honma K, Saji S, Moriwaki H, Ochiya T, Hoffman RM. Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:383-390, 2013
17. Takahashi RU, Takeshita F, Honma K, Ono M, Kato K, Ochiya T. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3 β . *Sci Rep*, 3:2474, 2013
18. Thirion M, Ochiya T. Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In: López-Camarillo C, Marchat LA (eds), *MicroRNAs in Cancer*. USA, CRC Press, pp 308-332, 2013
19. Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Jpn J Clin Oncol*, 43:596-607, 2013
20. Uchino K, Takeshita F, Takahashi RU, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H, Sonoke S, Yano J, Sasaki H, Nozawa S, Yoshiike M, Kitajima K, Chikaraishi T, Ochiya T. Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression. *Mol Ther*, 21:610-619, 2013
21. Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Expression of MicroRNAs in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 13:8259-8272, 2012
22. Morita S, Horii T, Kimura M, Ochiya T, Tajima S, Hatada I. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. *Int J Mol Sci*. 14: 14647-14658, 2013

2. 学会発表

国内

1. 「エクソソームによる肝疾患の診断治療への応用」, 落谷孝広、8th 肝免疫・ウイルス・フロンティア (Liver 2012) (2012.4.14 東京)
2. 「細胞分泌顆粒研究が医療を変える【エクソソームによる microRNA 伝搬の真実】」, 落谷孝広、Bio Tech 2012～国際 Bio Expo～ (2012.4.26 東京)

3. 「細胞外分泌型 miRNA 研究の親展開」, 落谷孝広、ヒューマンサイエンス振興財団・講演、(2012.6.7 東京)
 4. 「エクソソームを標的としたバイオマーカー開発の最前線」, 落谷孝広、21th 日本抗加齢医学会総会、(2012.6.22-24 横浜)
 5. 「細胞外分泌顆粒によるがん転移制御」, 落谷孝広、16th 日本がん分子標的治療学会 (2012.6.27-29 小倉)
 6. 「がん微小環境と DDS」, 落谷孝広、28th 日本 DDS 学会 (2012.7.3-5 札幌)
 7. 「核酸医薬の現状と展望：エクソソームによる新しい情報伝達と発がん」, 落谷孝広、松戸市医師会学術講演会 (2012.7.18 松戸)
 8. 「予防医学の原点を見つめ直す：食物摂取によるマイクロ RNA 制御と疾患との関わり」, 落谷孝広、4th RNAi 研究の最前線 (2012.7.20 東京)
 9. 「基調講演：エクソソームによる遺伝情報の水平伝達をもたらすがん研究の革命」, 落谷孝広、RNAi 研究会 (2012.8.30-9.1 広島)
 10. 「microRNA による抗がん剤抵抗性の制御とがん幹細胞治療」, 落谷孝広、第 55 回日本放射線影響学会 (2012.9.5-8 仙台)
 11. 「Micromanaging cancer stem cells by targeting ribophorin (リボフォリン 2 を標的としたがん幹細胞のマイクロマネージメント)」, 落谷孝広、第 71 回日本癌学会学術総会 (2012.9.19-21 札幌)
 12. 「エクソソーム製剤の開発 製造の課題と医薬応用への展望」, 落谷孝広、第 10 回 バイオロジクスフォーラム (2013.1.17 東京)
 13. 「体液エクソソームによる遺伝子情報の伝達と診断治療への応用」, 落谷孝広、産業技術総合研究所 次世代バイオナノ研究会 (2013.1.17-19 高松)
 14. 「核酸医薬開発の現状と展望」, 落谷孝広、第 15 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ 国立がん研究センター 国際研究交流会館 (2013.3.7 東京)
 15. Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I. Epigenetic similarity and difference of microRNA and protein-coding genes: Analysis by next-generation sequencing. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日, 福岡
 16. 分子がん転移研究の新たな潮流: エクソソームによる前転移ニッシェの実態解明」, 落谷孝広、22th 日本がん転移学会学術集会・総会 (2013.7.10-12 長野)
 17. 「細胞外分泌顆粒によるがん転移メカニズムの解明 (代: 小坂展慶)」, 落谷孝広、14th ホルモンと癌研究会 (2013.7.13 東京)
 18. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達の発見をもたらすインパクト」, 落谷孝広、第 5 回 ライフサイエンスセミナー (2013.7.17 東京)
 19. 「細胞外分泌顆粒: エクソソームによる細胞間情報伝達の意義と診断・治療への応用」, 落谷孝広、阿蘇シンポジウム、(2013.8.2 熊本)
 20. 「エクソソームによるがんの浸潤転移の解明と Liquid Biopsy への応用」, 落谷孝広、第 10 回 日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山、(2013.8.2 神戸)
 21. 「細胞間コミュニケーションの新たな担い手「エクソソーム」の正体と診断治療への応用」, 落谷孝広、34th 日本炎症・再生医学会、(2013.7.2 京都)
 22. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達と疾病診断治療治療への応用」, 落谷孝広、29th 日本 DDS 学会、(2013.7.4 京都)
 23. 「エクソソームの基礎と最新の話題」, 落谷孝広、京都大学再生医科学研究所・講演 (2013.8.8-9 京都)
- 畑田
24. Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I. Epigenetic similarity and difference of microRNA and protein-coding genes: Analysis by next-generation sequencing. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日, 福岡
 25. 森田純代、堀居拓郎、木村美香、落谷孝広、田嶋正二、畑田出穂 miR-29 は DNA メチル化酵素と DNA 脱メチル化酵素を制御する。第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日, 神戸
- 落谷孝広
- 海外**
1. Ochiya T. 「Direct Detection Of Extracellular Vesicles In Human Serum By ExoScreen System」. Expectations of the first meeting of International Society for Extracellular Vesicles, ISEV 2013, Boston, USA. April 15-21
 2. Ochiya T. 「Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer」. 2013 World CTC, Berlin, Deutschland. April 23-27
 3. Ochiya T. 「Hepatocyte from other sources of stem cell」. APASL Liver Week 2013, Suntec, Singapore. June 6-10

4. Ochiya T. Exoscreen provides a new diagnostic tool for circulating exosomes, ISEV Workshop 2014 on EV Proteomics and Lipidomics, Melbourne, Australia, Feb 3-4

**G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)**

- 1.特許取得
特になし。
- 2.実用新案登録
特になし。
- 3.その他